

## ХИМИЧЕН СЪСТАВ И МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА ЕКСТРАКТИ ОТ ЛИСТАТА НА *GINKGO BILOBA* L.

М. Йотова<sup>1</sup>, К. Калоянов<sup>2</sup>, Н. Хаджиева<sup>3</sup>, Е. Григоров<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Медицински колеж, МУ – Плевен

<sup>2</sup>Катедра по фармакология, токсикология и фармакотерапия,  
Фармацевтичен факултет, МУ – София

<sup>3</sup>Факултет по фармация, МУ – Варна

## THE CHEMICAL COMPOSITION AND MECHANISM OF ACTION OF THE *GINKGO BILOBA* L. LEAVES EXTRACTS

M. Yotova<sup>1</sup>, K. Kaloyanov<sup>2</sup>, N. Hadjieva<sup>3</sup>, E. Grigorov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Medical College, MU – Pleven

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Toxicology and Pharmacotherapy, Faculty of Pharmacy, MU – Sofia

<sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, MU – Varna

**Резюме.** *G. biloba* L. е растение, което е в основата на много хранителни добавки и на няколко лекарствени средства, разпространени в целия свят. Добре познат е неговият ефект върху паметта и реологичните свойства на кръвта. Според публикувани в научната литература данни, продуктите с гинко билоба се използват като адюванти при когнитивни разстройства, аритмии, исхемична болест на сърцето, захарен диабет и тромбози. От растението са изолирани редица вторични метаболити: терпеноиди, полифеноли, алилфеноли, органични киселини, въглехидрати, мастни киселини, липиди и неорганични соли. Основните биоактивни съставки в сухия екстракт от *G. biloba* L. са терпенови трилактони и флавоноидни гликозиди, които се считат за отговорни за фармакологичната му активност. Настоящото обзорно проучване описва химичния състав и механизма на действие на екстракта от *G. biloba* L.

**Ключови думи:** гинко билоба, състав, механизъм, гинколиди, билобалид

**Адрес за кореспонденция:** Гл. ас. маг. фарм. Мая Йотова, дф, Медицински колеж, Медицински университет, ул. Климент Охридски № 1, 5803 Плевен, e-mail: maya\_jo@abv.bg

**Abstract.** *Ginkgo biloba* L. is a widespread plant underlying many nutritional supplements and several medicines. Its effect on the memory and rheological properties of the blood is well known. According to data published in the scientific literature, *ginkgo biloba* products are used as adjuvants for cognitive disorders, arrhythmias, ischemic heart disease, diabetes and thrombosis. A number of secondary metabolites are isolated from the plant: terpenoids, polyphenols, allyl phenols, organic acids, carbohydrates, fatty acids, lipids and inorganic salts. The main bioactive compounds in the dry *ginkgo* extract are terpene trilactones and flavonoid glycosides that are considered to be responsible for its pharmacological activity. This overview study describes the chemical composition and mechanism of action of *Ginkgo biloba* extract.

**Key words:** *Ginkgo biloba*, constituents, mechanism, Ginkgolides, Bilobalid

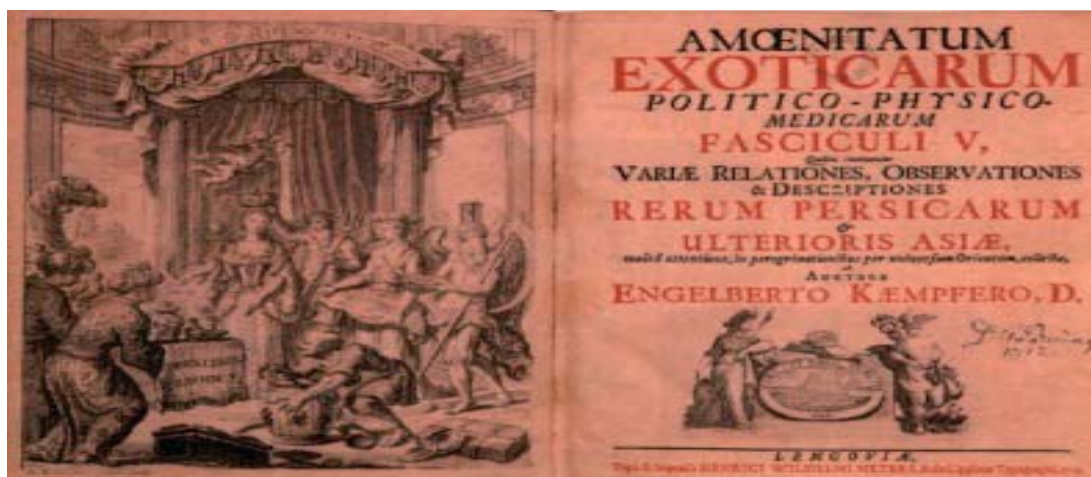
**Address for correspondence:** Assist. Prof. Maya Yotova, PhD, Medical College, Medical University, 1 Sv Kliment Ohridski Str, Bg – 5803 Pleven, e-mail: maya\_jo@abv.bg

## ВЪВЕДЕНИЕ

*Ginkgo biloba* L. е двудомно растение, описано за първи път от Карл Линей (1771). Дървото е с произход от Китай и поради връзката му с будизма и конфуцианството се отглежда широко в Корея и в части от Япония. Името „гинко билоба“ става известно за западния свят благодарение на немския лекар и ботаник Енгелберт Каемфер (Engelbert Kaempfer). В своя труд „*Amoenitates exoticae*“ той прави първото ботаническо описание на дърво гинко, което вижда в Нагасаки, Япония, за първи път през февруари 1691 г. По-късно пренася семена на гинко в Холандия. В Ботаническата градина в град Утрехт е било засадено едно от първите дървета гинко извън Азия, което може да се види и днес [16].

В момента дървото е единственият оцелял на Земята вид от семейство Ginkgoaceae, появили се преди 213 млн. години по време на Юрския период, и поради това се смята за жив фосил.

За първи път препарати от листа на *G. biloba* под търговското име Tebonin се предлагат на западния пазар през 1965 г. от германска компания – на д-р Вилмар Швабе (Dr. Willmar Schwabe). По-късно той в сътрудничество с френската фармацевтична фирма Beaufour-Ipsen развиват и създават съвместно стандартизирания екстракт от *G. biloba*, който наричат с кодовото наименование EGb 761, и впоследствие го регистрират с търговските имена Тапакан във Франция и Tebonin forte в Германия. Въпреки това, продуктите, съдържащи EGb 761, не са одобрени за употреба от Американската агенция за храни и лекарства (FDA) и единственият начин, по който те се разпространяват в САЩ, е под формата на хранителна добавка. В България гинко билоба се предлага като лекарствен продукт и също като хранителна добавка. Под формата на лекарства са регистрирани три монопродукта, съдържащи стандартизиран екстракт от гинко билоба:



Фиг. 1. Заглавна страница на „*Amoenitates exoticae*“ (снимка: интернет)

Царство:	Plantae	Растения
Отдел:	Ginkgophyta	Гинкови
Клас:	Ginkgoopsida	Гинкови
Разред:	Ginkgoales	Гинковидни
Семейство:	Ginkgoaceae	Гинкови
Род:	Ginkgo	Гинко
Вид:	<i>G. biloba</i>	Гинко билоба

Фиг. 2. *Ginkgo biloba* L. – единственият жив представител на отдел Гинкови (Ginkgoales)

1. Tebogan Forte 80 mg film-coated tablets  
2. Tanakan 40 mg film-coated tablets, Tanakan 40 mg/ml oral solution

3. Bilobil, Bilobil Forte, Bilobil Intens, както и редица комбинирани хранителни добавки като: Ginkgovin, Ginkgofol, Ginkgoprим max, Kamasutra, Selenogin, съдържащи екстракт от листата на *G. biloba* L.

Стандартизираният сух екстракт от *Ginkgo biloba* съдържа 24% флавонови гликозиди (главно кверцетин, кемпферол и изорамнетин) и 6% терпенови лактони (2.8-3.4% гинколиди А, В и С, и 2.6-3.2% билобалид). Гинколид В и билобалид представляват съответно около 0.8 и 3% от общия екстракт. Другите съставки включват проантоцианидини, глюкоза, рамноза, органични киселини, D-глюкарни и гинколови киселини. Монопрепаратите са разпределени в рискова категория за бременност (PRC) С и рискова категория за кърмене (LRC). В големи денонощни дози гинколовите киселини може да предизвикат тежки алергични реакции, както и увреждане на ДНК, което е рисково за възникване на неопластични заболявания [1].

**Таблица 1. Сравнителна таблица на процентното съдържание на биологично активни вещества в лекарството от гинко билоба спрямо препоръките на СЗО**

Изисквания по спецификация за EGb 761	EGb 761	Препоръки на СЗО
Флавонови гликозиди	24%	22-27%
Терпени:	6%	5-7%
Гинколиди А, В, С	3.1%	2.8-3.4%
Билобалиди	2.9%	2.6-3.2%
Гинколови киселини	2.9% < 2 PPM	2.6-3.2% < 5 PPM

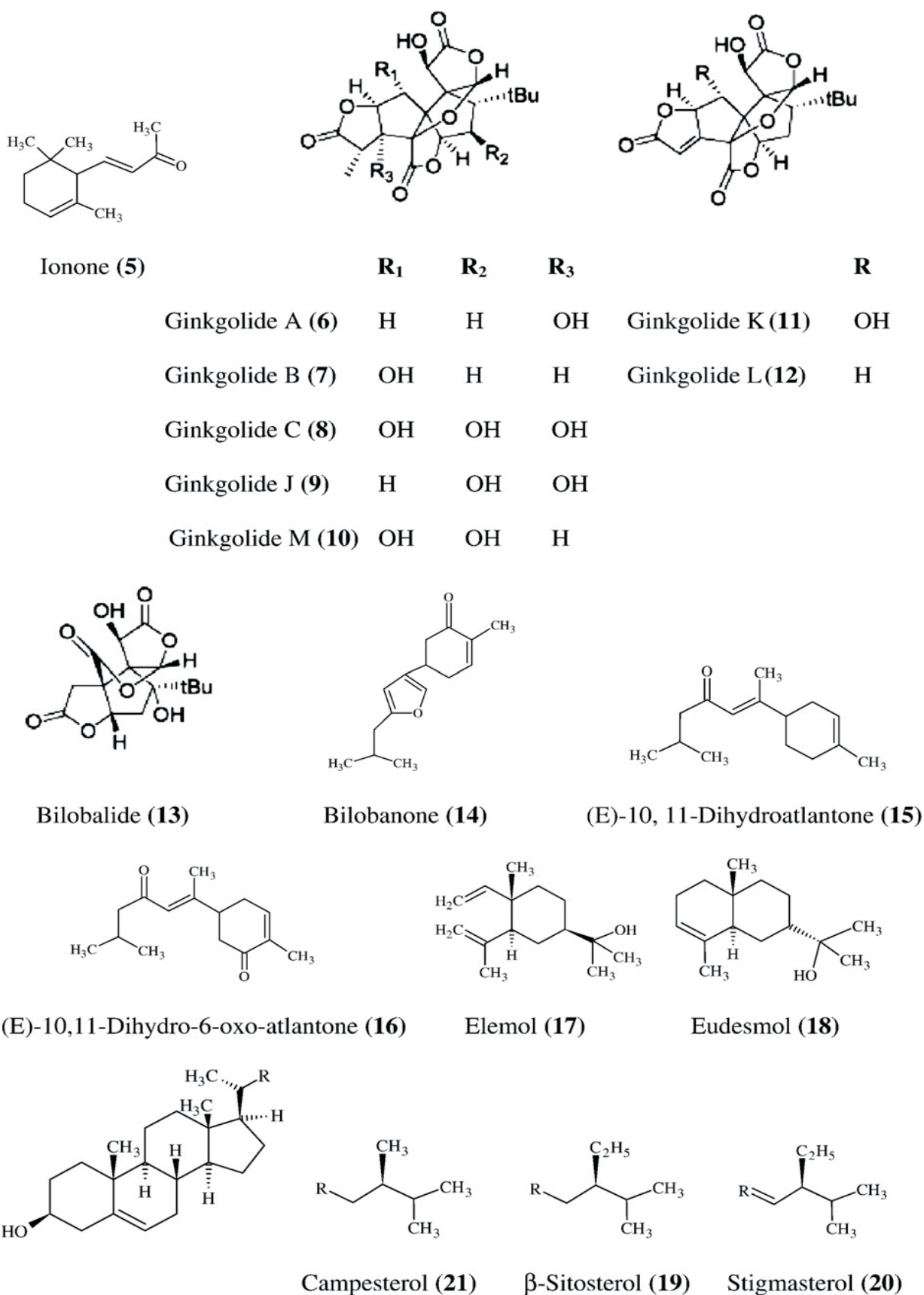
Идентифицираните биологично активни вещества принадлежат към четири основни химични класа: гинколиди, билобалиди и други терпеноиди, флавоноиди, полипреноли и алкилови феноли. Повечето от съединенията са общи – откриват се и при други висши растения, с изключение на някои бифлавонови и уникалните само за това растение терпенови трилактони. Съобщава се и за редица вторични метаболити, включително терпеноиди, полифеноли, алилфеноли, органични киселини, въглехидрати, мастни киселини и липиди, неорганични соли и аминокиселини. Терпеновите трилактони и флавоноидите се считат за основните биоактивни съставки в гинко билоба. Гинколидите са терпенови трилактони, съединения с подобна на клетка структура. Фурукава (1932 г.) изолира за първи път гинколид А, В, С и М от кората на корена на *G. biloba*. Гинколидите А, В, С също са изолирани и от листата на *G. biloba*. Интересно е да се

отбележи, че гинколид J е намерен само в листата, докато гинколид М се намира само в кората на корена на *G. biloba* [16]. В допълнение към гинколидите (дитерпени), в *G. biloba* също се открива и билобалид (сесквитерпен). Гинколидите К и L са открити наскоро. Гинколидите и билобалидът са известни общо като терпенови трилактони (TTLs). За терпеновите трилактони се съобщава, че присъстват само в *G. biloba*. Според проучванията досега терпеновите трилактони са единствените естествени продукти, притежаващи t-бутилова група в своята структура [18].

В сухите *Ginkgo* екстракти е описана група алкилфеноли (напр. гинколови киселини, гинколибиллобол), които могат да действат като потенциални алергени или токсични вещества. От съображения за безопасността на продукта, Monograph of the Commission E (Монография на Комисията Е на бившата Германска федерална здравна агенция – Bundesgesundheitsamt, BGA) въвежда изискване за максимална концентрация ( $\leq 5$  ppm) на гинколови киселини. Европейската фармакопея и тази на Съединените щати (USP 32) съдържат монографии относно стандартизирания сух екстракт от гинко билоба, посочващи същите изисквания към съдържанието на гинколови киселини. Производственият процес на стандартизирания екстракт от гинко билоба – EGb 761, елиминира алкилфенолите като водонеразтворими съединения от първичния ацетон екстракт. Неразтворимите във вода фракции са показали ембриотоксични ефекти и се установява, че LD50 при тестваните пилешки ембриони е в доза 1,8 mg/яйце (= 33 ppm). Подобен силен летален ефект върху тестовите обекти (LD50: 3.5 mg/яйце, 64 ppm) е наблюдаван и при фракция, съдържаща гинколови киселини [19]. Гинкольт, билоболът, както и други 3-алкилфеноли са получени от гинколова киселина и се откриват в листата, пъпките и черупките от *Ginkgo biloba* [8].

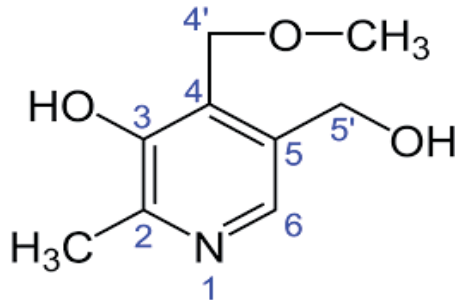
Друг доказано токсичен компонент в дрогата е 4-О-метилпиридоксин, който е мощен невротоксин. Той действа като антагонист на В6 и инхибира образуването на GABA, което води до конвулсии и загуба на съзнание.

Растителните лекарствени продукти трябва да отговарят на утвърдени стандарти относно оценката на ефикасността, безопасността и биофармацевтичното им качество. Тези изисквания обаче често са трудно изпълними. Въпреки съществуващия стандарт, съставът на екстрактите от листата на *G. biloba* варира в широки граници. Това се дължи на факта, че получаването им е свързано със сложни и многоетапни процеси на екстракция и концентрация.



Фиг. 3. Химични формули на основните вторични метаболити в гинко билоба [16]

Кресман и сътр. (2002) изследват различни търговски продукти и установяват, че отделните екстракти от *G. biloba* могат да съдържат различни количества свободни флавонолови аглиconi, особено кверцетин и кемпферол. Освен това някои продукти са съдържали почти 200 пъти повече гинколови киселини от други [10].



Фиг. 4. Химична формула на 4-О-метилпиридоксин

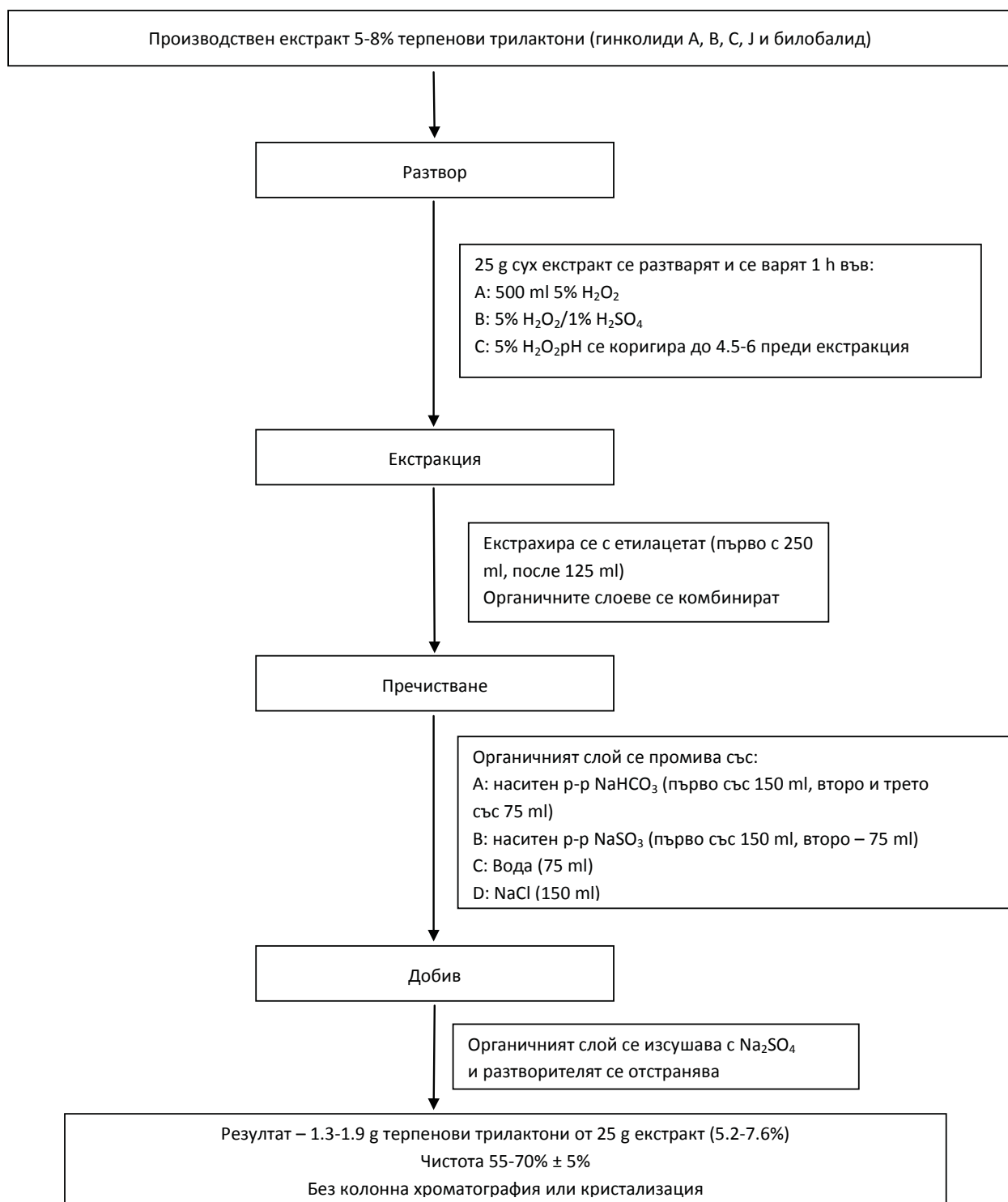
По този начин разликите в състава и бионаличността могат да доведат до значими разлики във фармакологичната активност, ефикасността, метаболизма и честотата на нежеланите ефекти, особено когато се използват високи дози. Тревога буди и фактът, че понастоящем лицензът на екстракта е изтекъл и компаниите производители добиват екстракти от *G. biloba* по различни технологии. Това води до разнородни количества на основните вещества в екстрактите от *G. biloba* и така значително се променят фармакологичният и токсикологичният профил на продукта. Ето защо се препоръчва употребата най-вече на стандартизиран продукт.

#### МЕХАНИЗМИ НА ДЕЙСТВИЕ НА ГИНКО БИЛОБА

Счита се, че флавоноидите и терпеновите трилактони са отговорни за повечето фармакологични ефекти на екстракта от *G. biloba*, като значение има и синергизмът между тях. Индуцираните от EGb 761 промени в мозъчната функция могат да доведат до забавяне на понижаващата се с възрастта серотонинова активност. Възможно е продължителна употреба да повиши  $\alpha 2$ -адренергичната рецепторна плътност в мозъчните мембрани. Някои автори доказват обратимото инхибиране на моноаминоксидазата (MAO) в мозъка при плъхове. При това и двата вида MAO-A и MAO-B са потиснати в еднаква степен (White et al., 1996). С цел изясняване в детайли на действието на гинко билоба върху ЦНС японски учени провеждат изследване върху ефектите от остро и многократно перорално приложение на стандартизирания екстракт EGb 761® върху екстрацелуларните нива на допа-

мин, норадреналин и серотонин (5-НТ). Единична перорална доза от EGb 761 (100 mg/kg) няма ефект върху нивата на моноамините. Въпреки това, след хронично лечение в денонощна доза 100 mg/kg, 14 дни, значително се повишават нивата на извънклетъчния допамин и норадреналин, докато нивата на 5-НТ не се повлияват. Хроничното лечение с EGb 761 показва зависимо от дозата повишаване на допаминовите нива [21]. Друг механизъм на гинколидите А, В и С е свързан с ефекта им върху PAF (platelet-activating factor receptor). Това е G-протеин-свързан рецептор, с химична структура на фосфолипид, участващ като медиатор в различни патологични процеси като: алергия, астма, септичен шок, артериална тромбоза и възпалителни процеси. Гореспоменатите гинколиди са естествени антагонисти на PAF. Инхибирането на рецептора води до потискане функцията на тромбоцитите.

В лабораторни условия е приложен екстракт от *G. biloba* върху опитни животни (плъхове), като се смесва с храната им в рамките на една седмица (0.5% екстракт от *G. biloba*). Последващо изследване на цитохром P450 монооксигеназите на експерименталните животни доказва, че билобалид и в някаква степен гинколид В действат, като увеличават значително активността на метаболизиращите чернодробни ензими [17]. Изследвания на ксенобiotичните ензими на изолирани човешки хепатоцити показват противоречиви резултати относно ефекта на екстракта от *G. biloba* върху тях. Hellum и сътр. [7] доказват, че екстрактът от *G. biloba* може и да индуцира и да инхибира CYP 1A2 и 2D6 в човешки първични хепатоцити. Индуцирането на CYP 1A2 и инхибирането на CYP 2D6 се наблюдава при ниски концентрации, докато инхибирането и на двата ензима е установено при високи концентрации. Проучвания с човешки чернодробни микросоми доказват, че при висока концентрация ( $K_i$  между 4,9 и 55 mg/ml) терпеноидни фракции на екстракт от *G. biloba* инхибират CYP 2C9, флавоноидни фракции инхибират CYP 2C9, CYP 1A2, CYP 2E1 и CYP 3A4 [4]. Също така екстракт от *G. biloba* ( $K_i$  162 mg/ml) инхибира активността на CYP 2B6 в човешки чернодробни микросоми [11]. Тези ефекти се срещат при приложение на високи концентрации, което най-вероятно е причината да липсват при терапевтични концентрации на екстракта. Проучвания при здрави доброволци показват, че дори високи дози от 400 mg EGb 761, приеман ежедневно в продължение на 13 дни, нямат ефект върху плазмения полуживот на антипирин, вещество, метаболизирано от чернодробния цитохром P450, ензими CYP 1A2, CYP 2B6, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C18 и CYP 3A4 [2]. Освен това резултатите при здрави добровол-



Фиг. 5. Схема на изолиране на тритерпенови трилактони от *G. biloba* (patent US 6,844,451 B2, Lichtblau et al., 2005)

ци показват, че GBE може да модулира метаболизма на мидазолам (който е субстрат на CYP 3A4) [14] или може да няма ефект [5]. Прием на терапевтични дози от екстракт от *G. biloba* (до 28 дни при денонощна доза 240 mg) не води до промяна в ензимната активност на CYP 3A4, CYP 1A2, CYP 2E1, CYP 2C9 или CYP 2D6 [5, 12, 13]. Проучване при здрави доброволци, след прилагане на 240 mg

дневно EGb761 в продължение на 8 дни, не установява инхибиране или индукция на CYP 1A2, CYP 2C9, CYP 3A, CYP 2C19 или CYP 2D6 [22].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Независимо че екстрактът от листата на *G. biloba* L. е познат от дълги години, някои от него-

вите ефекти върху човешкия организъм все още предстои да бъдат откривани. Огромната популярност на това растение сред населението е довела и до неговата комерсиализация под формата на множество хранителни добавки с неизяснен произход. Това налага специалистите да познават много добре основните аспекти от неговия фармакологичен и токсикологичен потенциал. Придържането на медицинските специалисти към фармацевтични продукти, съдържащи стандартизиран екстракт по фармакопейни изисквания, ще позволи на пациентите да се възползват от потенциалните ползи на *G. biloba L.*, избягвайки употребата на продукти с примеси. Многобройните ефекти на екстракта от листата на *G. biloba L.* върху различни органи и системи не предразполагат към увеличаване на лекарствените взаимодействия с други медикаменти, а напротив, водят до положителен благоприятен ефект при продължителна употреба.

#### БИБЛИОГРАФИЯ

1. Ламбев И. *Selecta medicamentorum*. Справочник за лекари, фармацевти и зъболекари. Семиздат, София, 2018.
2. Duche J, Barre J, Guonot P et al. Effect of Ginkgo biloba extract on microsomal enzyme induction. *Int. J. Clin. Pharm. Res.* 1989, 9(3): 165-168.
3. German Federal Institute for Drugs and Medical Devices (BfArM), [www.bfarm.de](http://www.bfarm.de)
4. Gaudineau C, Beckerman R, Welbourn S, et al. Inhibition of human P-450 enzymes by multiple constituents of the Ginkgo biloba extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 318(4): 1072-1078.
5. Gurley B, Gardner S, Hubbard M et al. Cytochrome P-450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002, 72(3): 276-287.
6. Heinonen T, Gaus W. Cross matching observations on toxicological and clinical data for the assessment of tolerability and safety of Ginkgo biloba leaf extract. *Toxicology.* 2015, 327: 95-115.
7. Hellum B, Hu Z, Nilsen O. The induction of CYP 1A2, CYP2D6 and CYP3A4 by six trade herbal products in cultured primary human hepatocytes. *Basic Clin. Pharmacol.* 2007, 100(1): 23-30.
8. Jaggy H, Koch E. Chemistry and biology of alkylphenols from Ginkgo biloba L. *Pharmazie.* 1997, 52(10): 735-738.
9. Koji N. Terpene trilactones from Ginkgo biloba: From ancient times to the 21st century. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13: 4987-5000.
10. Kressmann S, Biber A, Wonnemann M et al. Influence of pharmaceutical quality on the bioavailability of active components from Ginkgo biloba preparations, *J. Pharm. Pharmacol.* 2002, 54(11): 1507-14.
11. Lau A, Chang T. Inhibition of human CYP 2B6-catalyzed bupropionhydroxylation by Ginkgo biloba extract: effect of terpene trilactones and flavonols. *Drug Metab. Dispos.* 2009, 37(9): 1931-1937.
12. Markowitz J, Donovan J, Lindsay D et al. Multiple dose administration of Ginkgo biloba did not affect cytochrome P-450 2D6 or 3A4 activity in normal volunteers. *J. Clin. Psychopharm.* 2003, 2(6): 576-581.
13. Mohutsky M, Anderson G, Miller J et al. Ginkgo biloba: evaluation of CYP2C9 drug interactions in vitro and in vivo. *Am. J. Ther.* 2006, 13: 24-31.
14. Robertson S, Davey R, Voell J et al. Effect of Ginkgo biloba extract on lopinavir, midazolam and fexofenadine pharmacokinetics in healthy subjects. *Curr. Med. Res. Opin.* 2008, 24(2): 591-599.
15. Yilmaz SN. Effects of Ginkgo Glycosid (EGb761) on some vascular endothelial functions and renal histology in rabbits with acute cyclosporine nephrotoxicity. *Turkish J. Med. Sci.* 2000, 30(2): 109-114.
16. Singh B, Kaur P, Singh RD et al. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia.* 2008, 79(6): 401-18.
17. Sugiyama T, Kubota Y, Shinozuka K et al. Induction and recovery of hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with Ginkgo biloba extract. *Food Chem. Toxicol.* 2004, 42(6): 953-957.
18. Van Beek TA. Ginkgo biloba – medicinal and aromatic plants – industrial profiles. Vol. 12. Harwood academic publishers; 2000.
19. Weoerdenbag HJ, Van Beek TA. Ginkgo biloba. Vol. 3. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag, 1997; 51-66.
20. White HL, Scates PW, Cooper BR. Extracts of Ginkgo biloba leaves inhibit monoamine oxidase. *Life Sci.* 1996, 58(16):1315-21.
21. Yoshitake T, Yoshitake S, Kehr J. The Ginkgo biloba extract EGb 761® and its main constituent flavonoids and ginkgolides increase extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *Br. J. Pharm.* 2010, 159: 659-668.
22. Zadoyan G, Rokitta D, Klement S et al. Effect of Ginkgo biloba special extract EGb 7611 on human cytochrome P450 activity: a cocktail interaction study in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2012, 68(5): 553-560.